

The development of exhaled breath condensate: a noninvasive method of measuring airway inflammation

Citation for published version (APA):

Rosias, P. P. R. (2008). *The development of exhaled breath condensate: a noninvasive method of measuring airway inflammation*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20080214pr>

Document status and date:

Published: 01/01/2008

DOI:

[10.26481/dis.20080214pr](https://doi.org/10.26481/dis.20080214pr)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:


www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.



SUMMARY



Summary

This thesis is based on the principle of Antoine Laurent de Lavoisier, which states that air is not an element but a composite. When exhaled air is brought into contact with a cold surface, or condenser, the gas phase will change its state of matter, or condense, into a liquid phase, known as condensate. Exhaled breath condensate (EBC) implicates the cooling of exhaled breath in a condenser to collect the liquid condensate, and subsequently, the collected condensate can be analysed to measure its volatile and/or nonvolatile substances. These condensate (macro)molecules reflect ongoing respiratory processes, as they were released from the airway lining fluid into an excess of exhaled water vapour. In this thesis, we describe the development of exhaled breath condensate (EBC) into a feasible and highly efficient, noninvasive method, by which various biomarkers of inflammation and oxidative stress can be assessed in children of all ages.

In the introduction, we substantiate why there is a need for such a noninvasive technique (**chapter 1.1** to **chapter 1.5**). In children, wheezing and coughing are common respiratory symptoms, that may be attributed to acute as well as chronic pulmonary diseases, including common colds. Especially in growing children, chronic respiratory disorders have heterogeneous disease expression. In adults, chronic airway inflammation may be well documented. However, the opposite is true in children, for it is not that obvious to assess respiratory inflammation in this particular age group. Briefly, current diagnostic techniques are not suitable for use in clinical paediatric practice, as procedures are too complicated for young children to perform, or too invasive for routine application over a wide range. Logically, in children, there is a need for additional noninvasive markers of inflammation that enable accurate and early assessment of respiratory disease, as well as individual monitoring of its natural course, and/or response to treatment. Hence, the noninvasive measurement of biomarkers in EBC may offer new perspectives. Exhaled air can also be analysed in the gas phase, however, only to measure its volatile substances, such as the exhaled nitric oxide fraction. Nitric oxide has been validated as a volatile marker of eosinophilic asthmatic inflammation. Recently, the first randomised controlled trial in asthmatic children, aged six years or more, demonstrated the successful titrating of inhaled corticosteroids using exhaled nitric oxide fraction. Additionally, EBC may even offer some advantages, compared to exhaled nitric oxide. The collection of EBC requires only minimal cooperation of a tidal breathing subject. Moreover, the analysis of EBC may reveal the presence of multiple biomarkers, instead of only one specific volatile substance, and hence, EBC analysis may also prove to be useful in discriminating and monitoring of more than one inflammatory lung disease.

In this thesis, we hypothesised that the noninvasive EBC methodology can evolve from a simple home made experimental research tool into a useful means of assessing inflammatory disease status, especially in preschool children. Therefore, this thesis is not a clear cut enumeration of consecutive proceedings on EBC methodology, but a report of our search for an improved EBC collection system, improved EBC analysis, and its application in clinical paediatric practice.

The first part of this thesis focused on EBC collection. Initially, condensate was collected using a wide diversity of condenser designs (as reviewed in **chapter 1.6** and **chapter 2**), including a borosilicate glass distilling column, as used in two - early - cross sectional studies in children, aged 5 years or more, with asthma (**chapter 3**) and cystic fibrosis (**chapter 7**), respectively. Subsequently, we demonstrated that a borosilicate glass condenser was more efficient to measure 8-isoprostane and albumin in EBC, compared to five other condenser types (**chapter 4.2**). We mainly attributed this significant difference to distinct adhesive interactions between the inner condenser coatings and the exhaled biomarkers. Accordingly, glass was used as basic material to further optimise the condensation process. Hence, we presented an open glass condenser system with enlarged condenser surface, improved condensate recovery using an inclined condenser tube setting and a condensate sweeping plunger, with several tangential and axial breath flow channels to guide exhaled breath towards the cooled inner condenser wall (**chapter 5**). We demonstrated, in healthy adults, that the open glass condenser not only yielded significantly more EBC volume, but was also associated with more detections of hydrogen peroxide, 8-isoprostane, and several cytokines in the collected EBC, than other condenser types. Succeedingly, the condenser system was modified for use in preschool children (**chapter 8**). For this purpose, the glass condenser was closed with an unique, heated (at 37 degrees Celsius), breath recirculation system, in such a way that the formerly lost noncondensed exhaled breath was separately being collected in a gradually inflating inert Tedlar™ gas sample bag. When the child ceased the 'usual' EBC collection procedure, the separately collected exhaled breath was recirculated, from the gas sample bag, back into the condenser system, to perform a secondary breath condensation. This new concept of EBC collection before and after breath recirculation, allowed condensation of the totally exhaled breath volume, whether gathered after only a few minutes of EBC collection, or after a prolonged period. Moreover, this concept enabled the collection of significantly more EBC volume compared to the 'usual' (before breath recirculation) procedure, whereas in toddlers with limited cooperation in time, breath recirculation was often crucial to yield minimal but sufficient condensate volume (to analyse for biomarkers). Cumulatively, the success rate was 83 per cent in preschool children with and without wheezing illness. Furthermore, we demonstrated that all cytokine concentrations in EBC, collected before and after breath recirculation, were comparable, which illustrated the efficiency of the new method of EBC collection in preschool children.

The second part of this thesis focused on EBC analysis. Initially, an increasing number of biomarkers were detected (or not) in EBC, using a wide diversity of conventional assays (as reviewed in **chapter 1.6** and **chapter 2**). In children, incidental reports on detected biomarkers included hydrogen peroxide, nitrogen oxides, eicosanoids, (three) cytokines, condensate acidity, and aldehyde/gluthatione (as reviewed in **chapter 1.6** and **chapter 2**). Moreover, many different condenser designs were in use, and most conventional assays were lacking sufficient sensitivity for appropriate use in this new medium with macromolecules that are 'drowned' in an excess of water vapour (**chapter 4.1**). Not surprisingly, biomarker reproducibility was

often poor, and sometimes even highly questionable. Several research groups addressed this issue for specific biomarker measurements mainly by introducing analytical modifications, and/or by exploring various study populations. Meanwhile, we demonstrated a significant interaction between the method of EBC collection and its subsequent analysis, and found glass condensers more efficient, as stated above (**chapter 4.2**). Also, we focused on the measurement of cytokines, as potentially highly interesting markers of airway inflammation in EBC. We tried to detect cytokines in large EBC samples by means of conventional specific enzyme immunoassays, however without successful cytokine detection (**chapter 3**). Subsequently, we used multiplexed cytometric bead array to measure simultaneously different cytokines in small EBC samples, and reached a level of detection of nearly 50 per cent, in five out of six assayed cytokines (**chapter 7**). Succeedingly, we were able to increase the cytokine detection level at 95 to 100 per cent, in all (eight) assayed cytokines, by introducing multiplexed liquid bead array (**chapter 8**). Similarly, we were interested in specific markers of oxidative stress in EBC. We demonstrated the presence of free radicals in EBC by means of electron paramagnetic resonance spectroscopy (**chapter 6**). However, this procedure is not likely suitable for future routine use in EBC due to its elaborative nature, although the presence of these free radicals in EBC may provide some further evidence for its reflection of the airway lining fluid composition.


The third part of this thesis focused at the clinical application of EBC. The cross sectional childhood asthma study showed low correlations between single exhaled inflammatory markers and conventional asthma measures (**chapter 3**). In children with cystic fibrosis, other exhaled inflammatory markers, including exhaled nitric oxide, were differently combined, and were able to indicate diagnosis, exacerbation, and (to a lesser extent) disease severity, though confirmation in a longitudinal context is needed (**chapter 7**). In preschool children with different wheezing phenotypes, the central issue consists of finding a noninvasive measure to identify underlying persisting airway disease, such as atopic asthmatic inflammation. In contrast to nonasthmatic states, such as viral wheeze and healthy children, atopic asthma is characterised by a predominantly T-helper 2-mediated chronic eosinophilic airway inflammation. Therefore, the closed glass condenser with breath recirculation system, and multiplexed liquid bead array were used to assess T-helper 1 and T-helper 2 cytokine profiles in EBC in preschool children with and without different wheezing phenotypes (**chapter 8**). Accordingly, we demonstrated *for the first time noninvasively* several significant differences between probably asthmatic and nonasthmatic preschool children. Tumor necrosis factor-alpha concentrations in EBC were significantly decreased, whereas the ratios of interleukin-5 to tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-13 to tumor necrosis factor-alpha in EBC were significantly increased in the probably atopic asthmatic group, compared to nonasthmatics. These findings in preschool children, may provide *noninvasive* evidence for an early skewing of the T-helper 2 to T-helper 1 balance in favour of an allergy-promoting T-helper 2 response.

Directions for future research should include the origin and (patho)physiology of EBC formation, standardisation of EBC measurements, identification of specific and

useful exhaled biomarker profiles in different respiratory diseases, and application of these profiles in longitudinal clinical trials on the monitoring of asthma and cystic fibrosis, including their relationship with exhaled nitric oxide, and inflammatory markers in induced sputum and/or bronchoalveolar lavage.

In conclusion, the noninvasive methodology of EBC collection and analysis has developed into a feasible and highly efficient method, that enabled *noninvasive inflammometric profiling* in nonsedated preschool children with different wheezing phenotypes. We believe that *noninvasive inflammometric profiling* will contribute to an improvement of diagnosis and customised care in children of all ages with chronic respiratory disease, whereas this inevitably will generate new insights that may ultimately lead to alter some of the previously agreed disease management strategies (**chapter 9**).





SAMENVATTING



Samenvatting

Dit proefschrift is gebaseerd op het principe van Antoine Laurent de Lavoisier, dat stelt dat lucht geen eenvoudig element is, maar een samengesteld mengsel. Wanneer uitgeademde lucht in aanraking komt met een koud oppervlak, of kondenser, zal de aggregatietoestand van lucht overgaan van de gas fase in een vloeibare fase, of met andere woorden: kondenseren tot kondensaat. Kondensaat van uitgeademde lucht (Engels: *exhaled breath condensate*) impliceert zowel het afkoelen van uitgeademde lucht in een kondenser om alzo het vloeibare kondensaat te verzamelen, als het analyseren van het verzamelde kondensaat om de vluchtige en niet-vluchtige bestanddelen ervan te kunnen meten. Deze bestanddelen of (macro)moleculen zijn vrijgekomen uit de vochtlaag die de binnenkant van de luchtwegen bedekt, en worden vervolgens meegenomen door een overmaat aan waterdamp die uitgeademd wordt. Op deze manier vormen de (macro)moleculen in kondensaat een weerspiegeling van de zich ontwikkelende processen in de luchtwegen. In dit proefschrift beschrijven we de ontwikkeling van kondensaat van uitgeademde lucht tot een vlot uitvoerbare en zeer efficiënte, niet-invasieve methode waardoor uiteenlopende (macro)moleculen of merkstoffen voor ontsteking en oxidatieve stress bepaald kunnen worden bij kinderen van alle leeftijden.

In de inleiding staven we onze bewering dat er behoefte is aan een dergelijke niet-invasieve techniek (**hoofdstuk 1.1** tot **hoofdstuk 1.5**). Bij kinderen, zijn piepen en hoesten vaak voorkomende luchtwegklachten, die toegeschreven kunnen worden aan zowel acute als chronische luchtwegaandoeningen, een gewone verkoudheid inbegrepen. Chronische luchtwegaandoeningen worden gekenmerkt door een heteroogene ziekte expressie, met name bij het opgroeiende kind. Bij volwassenen zijn gelijkaardige chronische luchtwegontstekingen relatief goed gedocumenteerd. Echter, het tegenovergestelde is waar bij kinderen, aangezien het niet zo voor de hand liggend is om een chronische luchtwegontsteking objectief vast te stellen in deze specifieke leeftijdsgroep. Immers, de huidige diagnostische technieken zijn niet geschikt voor een vlotte toepassing in de paediatrische praktijk, ofwel omdat de procedures te ingewikkeld zijn om sowieso door een jong kind uitgevoerd te kunnen worden, ofwel omdat de procedures te invasief zijn voor routinematig gebruik bij de vele verschillende paediatrische luchtwegproblemen. Logischerwijze bestaat er voor kinderen dus een behoefte aan bijkomende niet-invasieve merkstoffen voor ontsteking die niet alleen een nauwkeurige en vroegtijdige diagnose van een luchtwegaandoening mogelijk maken, maar ook een individueel toezicht op het natuurlijke beloop van een aandoening, en/of de reactie op een behandeling mogelijk maken. Derhalve kan het niet-invasief meten van merkstoffen in kondensaat van uitgeademde lucht nieuwe perspectieven bieden. Uitgeademde lucht kan eveneens geanalyseerd worden in de gas fase, echter uitsluitend voor het meten van vluchtige stoffen, zoals bijvoorbeeld de uitgeademde stikstofmonoxide fractie. Het vluchtige stikstofmonoxide in uitgeademde lucht werd gevalideerd als een merkstof voor de eosinofiele luchtwegontsteking bij astma. Onlangs toonde de eerste willekeurig geselecteerde en gecontroleerde studie bij kinderen met astma vanaf de leeftijd van zes jaar, dat de behandeling met inhalatie

corticosteroïden succesvol getitreerd kon worden, door gebruik te maken van de uitgeademde stikstofmonoxide fractie. In vergelijking met stikstofmonoxide, kan kondensaat van uitgeademde lucht zelfs enkele bijkomende voordelen bieden. Immers, het verzamelen van kondensaat vergt slechts een minimale medewerking van een rustig ademend individu. Daarenboven, kan grondige analyse van kondensaat de aanwezigheid onthullen van meerdere verschillende merkstoffen, in plaats van slechts één vluchtige stof zoals stikstofmonoxide. Dus, de analyse van kondensaat van uitgeademde lucht kan bruikbaar zijn voor het onderscheiden van én toezicht houden op meer dan één type luchtwegontsteking.

In dit proefschrift, veronderstellen we dat de niet-invasieve kondensaat methode kan uitgroeien van een eenvoudig experimenteel probeersel, tot een bruikbaar instrument om luchtwegontstekingen te meten, met name bij peuters en kleuters. Dit proefschrift is geen opsomming van opeenvolgende, scherp-omlijnde stappen, maar een verslag van onze zoektocht naar zowel een verbeterd verzamelstelsel, als een verbeterde analysetechniek voor kondensaat van uitgeademde lucht, inclusief de toepassing ervan in de paediatrische praktijk.

Het eerste deel van dit proefschrift behelst het verzamelen van kondensaat van uitgeademde lucht. In eerste instantie, werd kondensaat verzameld door middel van vele verschillende soorten condensers (waarvan een overzicht gegeven wordt in **hoofdstuk 1.6** en **hoofdstuk 2**), inclusief een glazen distilleerkolom, zoals gebruikt werd in de twee vroege cross-sectionele studies bij kinderen ouder dan vijf jaar, met respectievelijk astma (**hoofdstuk 3**) en taai slijmziekte (**hoofdstuk 7**). Vervolgens, hebben we aangetoond dat een glazen condenser meer efficiënt was voor het meten van twee merkstoffen, met name 8-isoprostaan en albumine, in kondensaat van uitgeademde lucht, in vergelijking met vijf andere types condenser (**hoofdstuk 4.2**). Dit significant verschil werd hoofdzakelijk toegeschreven aan de verschillende adhesieve wisselwerkingen tussen de binnenste condenserwand en de uitgeademde merkstoffen. Dienovereenkomstig, werd besloten voortaan glas te gebruiken als basismateriaal voor het verder optimaliseren van het condensatie proces. Vandaar dat vervolgens een open, glazen condenser systeem gepresenteerd werd, met een vergroot kondenseeropervlak, en een verbeterde mogelijkheid tot het oogsten van kondensaat, middels een schuine opstelling van de kondenseerbuis, én middels een vegende pluiner voorzien van meerdere tangentiële en axiale lucht-kanalen om alzo de uitgeademde lucht te geleiden tot tegen de gekoelde binnenste condenserwand (**hoofdstuk 5**). Bij gezonde volwassenen werd aangetoond dat deze open, glazen condenser niet alleen significant meer kondensaat volume voortbrengt, maar ook geassocieerd is met meer detecties van waterstofperoxide, 8-isoprostaan, en verschillende cytokines in het verzamelde kondensaat van uitgeademde lucht, in vergelijking met andere types condenser. Vervolgens, werd het kondenseer systeem verder aangepast voor gebruik bij peuters en kleuters (**hoofdstuk 8**). Hiertoe, werd de glazen condenser gesloten met een uniek en tot 37 graden Celsius verwarmd adem recirculatie systeem, op een dusdanige manier dat de anders verloren gegane uitgeademde maar niet-gekondenseerde lucht, apart wordt opgevangen in een zich

langzaam opblazende inerte Tedlar™ monster-zak voor gasvormige stoffen. Wanneer het kind ophoudt met de gebruikelijke condensaat verzamelprocedure, wordt de apart verzamelde, uitgeademde maar niet-gekondenseerde lucht opnieuw in circulatie gebracht, vanuit de Tedlar™ zak, terug in het kondenseer systeem, om alzo een tweede bijkomende condensatie mogelijk te maken. Dit nieuwe concept voor het verzamelen van condensaat, zowel voor als na adem recirculatie, maakt een volledige condensatie mogelijk van *alle* uitgeademde lucht, of die nu verkregen werd in slechts enkele minuten of na een veel langere periode. Daarenboven, werd het door dit concept mogelijk om significant meer condensaat volume te verzamelen in vergelijking met de gebruikelijke (vóór de adem recirculatie) procedure, terwijl bij peuters die slechts beperkt in de tijd meewerken, deze adem recirculatie dikwijls cruciaal was om een minimale, maar net voldoende hoeveelheid condensaat te verkrijgen voor verdere analyse. De methode was succesvol bij 83 procent van de onderzochte peuters en kleuters met en zonder piepende luchtwegaandoening. Daarenboven hebben we aangetoond dat alle cytokine concentraties in condensaat van uitgeademde lucht, verzameld zowel voor als na de adem recirculatie, volstrekt vergelijkbaar waren, hetgeen de efficiëntie bevestigt van deze nieuwe methode van condensaat verzamelen bij jonge kinderen.

Het tweede deel van dit proefschrift behelst de analyse van condensaat van uitgeademde lucht. In eerste instantie, werd van alsmear meer merkstoffen de aantoonbaarheid (al dan niet) in condensaat onderzocht met behulp van één van de vele gebruikelijke analyse-technieken (een overzicht van deze merkstoffen wordt gegeven in **hoofdstuk 1.6** en **hoofdstuk 2**). Bij kinderen verscheen slechts incidenteel een publicatie over de ontdekking van merkstoffen, zoals waterstofperoxide, stikstofoxide-verbindingen, eicosanoïden, (drie) cytokines, de zuurtegraad van condensaat, alsook aldehyde en glutathione (waarvan een overzicht gegeven wordt in **hoofdstuk 1.6** en **hoofdstuk 2**). Daarenboven waren zeer diverse ontwerpen voor allerlei kondenseertoestellen in gebruik, en waren de meeste van de traditionele analyse-technieken niet gevoelig genoeg voor gebruik in condensaat, waarbij de erin aanwezige (macro)moleculen verdronken zijn in een overvloed aan water(damp) (**hoofdstuk 4.1**). Het is daarom niet verrassend dat de reproduceerbaarheid van merkstoffen in condensaat vaak slecht en soms zelfs hoogst twijfelachtig was. Een aantal onderzoekers benaderden dit probleem hoofdzakelijk door voor enkele specifieke merkstoffen ofwel een aangepaste analyse-techniek te ontwikkelen, ofwel te zoeken in andere patiëntenpopulaties. Intussen toonden wij een significante wisselwerking aan tussen de manier van condensaat verzamelen en de daaropvolgende analyse van het condensaat (**hoofdstuk 4.2**). Glazen condensers bleken meer efficiënt te zijn, zoals hierboven reeds werd vermeld. Bovendien richtten we onze aandacht ook op de analyse van cytokines, aangezien dit uiterst interessante merkstoffen zijn voor vele types van luchtwegontsteking. We probeerden eerst cytokines te ontdekken in grote hoeveelheden condensaat door middel van de traditionele enzymatische immuuntesten, echter zonder enig succes (**hoofdstuk 3**). Vervolgens gebruikten we de cytometrische veelvoudige bepalingstechniek (Engels: *multiplexed cytometric bead array*) waarmee tegelijkertijd verschillende cytokines gemeten konden worden in slechts een minimale hoeveelheid van 50 microliter condensaat (**hoofdstuk 7**). Hiermee verkregen we

bijna 50 procent detectie voor vijf van de zes geteste cytokines. Daarna, waren we verder in staat om het niveau van detectie voor cytokines in kondensaat op te hogen tot 95 à 100 procent voor alle acht onderzochte cytokines, door gebruik te maken van de vloeibare veelvoudige bepalingstechniek (Engels: *multiplexed liquid bead array*) (**hoofdstuk 8**). Ook in specifieke merkstoffen voor oxidatieve stress waren we geïnteresseerd. Wij toonden de aanwezigheid aan van vrije radicalen in kondensaat van uitgeademde lucht, door middel van elektronische paramagnetische resonantie spectroscopie (**hoofdstuk 6**). Helaas is deze complexe procedure waarschijnlijk niet geschikt voor routinematig gebruik, juist omwille van de grote mate van bewerkelijkheid. Anderzijds is de aanwezigheid van deze vrije radicalen in kondensaat van uitgeademde lucht wel een bijkomend ondersteunend argument voor de in kondensaat weerspiegelde samenstelling van de vochtlaag binnenin de luchtwegen.

Het derde deel van dit proefschrift behelst de klinische toepassing van kondensaat van uitgeademde lucht. De vroege cross-sectionele kinderastma studie toonde slechts lage correlaties aan tussen afzonderlijke uitgeademde merkstoffen voor luchtwegontsteking, en de gebruikelijke astma metingen (**hoofdstuk 3**). Bij kinderen met taai slijmziekte werden andere uitgeademde merkstoffen voor ontsteking, waaronder de stikstofmonoxide fractie, op uiteenlopende wijze met elkaar gecombineerd (**hoofdstuk 7**). Op deze manier vormden verschillende combinaties van uitgeademde merkstoffen een goede aanwijzing voor respectievelijk de diagnose, de verergering, en (in mindere mate) de ernst van de taai slijmziekte, ofschoon dit uiteraard nog op lange termijn bevestigd moet worden. Intussen werd het verzamelen en analyseren van kondensaat van uitgeademde lucht verder aangepast zoals reeds beschreven. Het centrale vraagstuk bij peuters en kleuters met verschillende fenotypes van piepende ademhaling, bestaat uit het vinden van een niet-invasieve manier om een onderliggende persisterende luchtwegaandoening, zoals een atopisch astmatische ontsteking, te identificeren. In tegenstelling tot niet-astmatische beelden, zoals bij viraal piepen en bij gezonde kinderen, wordt atopisch astma gekenmerkt door een hoofdzakelijk T-helper 2-gestuurde chronische eosinofiele luchtwegontsteking. Een gesloten, glazen condenser met adem recirculatie systeem, en een vloeibare veelvoudige bepalingstechniek (Engels: *multiplexed liquid bead array*) werden daarom gebruikt om profielen van T-helper 1 en T-helper 2 cytokines in kondensaat van uitgeademde lucht te bepalen bij peuters en kleuters met en zonder verschillende fenotypes van piepende ademhaling (**hoofdstuk 8**). Alzo toonden we *voor de eerste keer op een niet-invasieve manier* aan dat het cytokine profiel van waarschijnlijk astmatische en niet-astmatische peuters en kleuters significant verschilt. De concentratie van tumor necrosis factor-alpha in kondensaat was significant gedaald, terwijl de verhouding van interleukine-5 ten opzichte van tumor necrosis factor-alpha, en van interleukine-13 ten opzichte van tumor necrosis factor-alpha in kondensaat significant waren gestegen bij de waarschijnlijk atopisch astmatische kinderen, in vergelijking met de niet-astmatische kinderen. Deze bevindingen bij astmatische peuters en kleuters levert een *niet-invasief* bewijs voor een vroegtijdige verschuiving van de T-helper 2 ten opzichte van T-helper 1 balans, ten voordele van een allergie-bevorderende T-helper 2 respons.

Richtlijnen voor toekomstig onderzoek zouden de oorsprong en pathofysiologie van de vorming van condensaat van uitgeademde lucht moeten omvatten, alsook het standaardiseren van metingen met condensaat van uitgeademde lucht, het identificeren van specifieke en bruikbare profielen van merkstoffen voor verschillende fasen van verschillende luchtwegaandoeningen, en het gebruik van deze profielen in lange termijn studies over het vervolgen in de tijd van chronische luchtwegaandoeningen, met inbegrip van de verhoudingen ten opzichte van de uitgeademde stikstofmonoxide fractie, en ten opzichte van merkstoffen voor ontsteking in geïnduceerd sputum en/of bronchoalveolair lavage vocht.

Tot besluit kunnen we stellen dat de niet-invasieve methode van het verzamelen en analyseren van condensaat van uitgeademde lucht zich heeft ontwikkeld tot een vlot uitvoerbare en uiterst efficiënte methode die *niet-invasieve inflammometrische profilering* mogelijk maakt bij (niet-verdoofde) peuters en kleuters met verschillende fenotypes van piepende ademhaling. Wij zijn ervan overtuigd dat *niet-invasieve inflammometrische profilering* zal bijdragen tot een verbetering van de diagnose stelling en van de op maat gemaakte zorg voor kinderen van alle leeftijden met een chronische luchtwegaandoening. Dit zal onvermijdelijk leiden tot nieuwe inzichten die uiteindelijk weer kunnen leiden tot een verandering van de huidige geldende beleidsstrategieën voor chronische luchtwegaandoeningen (**hoofdstuk 9**).